

**ANALISIS MUTU MINYAK ATSIRI BUNGA CENGKEH
(*Syzygium aromaticum* (L.) Meer. & Perry) DARI MALUKU,
SUMATERA, SULAWESI DAN JAWA DENGAN METODE
METABOLOMIC BERBASIS *GC-MS***

SKRIPSI



Oleh :

**RIZKY FARAH MEGAWATI
K 100 060 027**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SURAKARTA
SURAKARTA
2010**

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Minyak atsiri merupakan salah satu komoditas ekspor agroindustri potensial yang dapat menjadi andalan bagi Indonesia untuk mendapatkan devisa. Data statistik ekspor–impor dunia menunjukkan bahwa konsumsi minyak atsiri dan turunannya naik sekitar 10% dari tahun ke tahun (Dewan Atsiri Indonesia dan IPB, 2009). Volume perdagangan minyak atsiri dunia diperkirakan bernilai sekitar USD 4 miliar pada tahun 2007. Perkiraan konsumsi minyak cengkeh di dunia saat ini sekitar 3500 ton/tahun. Indonesia adalah salah satu pengeksport utama minyak atsiri dunia dengan nilai ekspor minyak atsiri dan turunannya lebih dari USD 120 juta pada tahun 2007 (Mulyadi, 2008).

Terdapat kurang lebih 45 jenis tanaman penghasil minyak atsiri tumbuh di Indonesia, namun baru kira–kira 15 jenis yang sudah menjadi komoditi ekspor, salah satu diantaranya yaitu minyak daun, gagang, dan bunga cengkeh (*Clove leaf, stem, bud oil*) (Ma'mun, 2006). Minyak bunga cengkeh mengandung minyak atsiri lebih banyak daripada minyak gagang cengkeh dan minyak bunga cengkeh. Kandungan minyak atsiri dari bunga cengkeh sekitar 10–20% (Nurdjannah, 2004). Mulyadi (2008) mengemukakan bahwa Indonesia merupakan produsen utama minyak cengkeh yang memproduksi sekitar 2500 ton pada tahun 2007.

Minyak cengkeh memiliki banyak metabolit yang bermanfaat bagi manusia. Secara tradisional minyak cengkeh digunakan untuk obat sakit gigi.

Metabolit cengkeh yang paling banyak adalah eugenol, eugenol asetat, dan kariofilen. Senyawa-senyawa tersebut mempunyai sifat sebagai antibakteri dan antijamur (Ayoola *et al.*, 2008). Eugenol, iso-eugenol, dan zat vanili dalam minyak atsiri cengkeh dipakai pada industri kimia sebagai zat dasar untuk menyusun bermacam-macam jenis persenyawaan (Anonim, 1991). Turunan eugenol atau turunan metoksifenol secara besar-besaran digunakan dalam parfum, perasa (*flavoring*), formulasi obat oles anti nyamuk, penyerap UV, analgetik, *bioside*, antiseptik, stabilisator dan antioksidan pembuatan plastik dan karet (Lee dan Shibamoto, 2001 *cit* Alma *et al.*, 2007). Minyak cengkeh mempunyai aktivitas biologi sebagai antivirus terhadap virus hepatitis C (Hussein *et al.*, 2000 *cit* Chaieb *et al.*, 2007). Eugenin yang ada didalam minyak atsiri cengkeh diidentifikasi sebagai senyawa anti-HSV (Kurokawa *et al.*, 1998 *cit* Chaieb *et al.*, 2007). *Cinamaldehyde* dari minyak cengkeh dapat mereduksi mutagenesis yang diinduksi UV sebgus mutagenesis yang induksi oleh *furylfuramide* (AF-2) dalam *E. Coli* WP2s (Ohta *et al.*, 1983 *cit* Chaieb *et al.*, 2007).

Mutu minyak atsiri sangat ditentukan oleh sifat dan senyawa kimia yang terkandung di dalamnya. Sejauh ini belum ada penelitian tentang penentuan mutu minyak atsiri berdasarkan senyawa kimia yang terkandung didalamnya. Kebanyakan penentuan mutu minyak atsiri didasarkan pada sifat fisik seperti bobot jenis, indeks bias, putaran optik, dan kelarutan di dalam etanol 70%. Penentuan mutu berdasarkan kandungan metabolit dalam minyak atsiri sangat penting untuk mengetahui secara umum komponen kimia yang terdapat didalamnya. Komposisi kimia minyak atsiri akan menentukan nilai dan kegunaan

minyak atsiri tersebut (Ketaren, 1985). Penelitian ini dilakukan untuk memberikan gambaran mengenai metabolit dalam minyak cengkeh dari daerah di Pulau Sumatera, Sulawesi, Maluku, dan Jawa yang berhubungan dengan mutu minyak cengkeh yang diperoleh dengan destilasi uap dan air.

B. Perumusan Masalah

Berdasar uraian latar belakang diatas dapat dirumuskan masalah sebagai berikut:

1. Kandungan metabolit sekunder apakah yang ada dalam minyak atsiri bunga cengkeh (*Syzygium aromaticum* (L.) Meer. & Perry) yang diperoleh dengan destilasi uap dan air dianalisis menggunakan GC-MS?
2. Daerah mana yang mempunyai mutu minyak atsiri bunga cengkeh yang bagus berdasarkan kelengkapan kandungan metabolitnya?

C. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk:

1. Mengidentifikasi jenis metabolit sekunder bunga cengkeh (*Syzygium aromaticum* (L.) Meer. & Perry) yang berasal dari Maluku, Sumatera, Sulawesi, Jawa diperoleh dengan destilasi uap dan air yang dianalisis menggunakan GC-MS.
2. Menentukan daerah yang mempunyai mutu bunga cengkeh yang bagus berdasar kelengkapan kandungan metabolitnya.

D. Tinjauan Pustaka

1. Tumbuhan cengkeh

a. Sistematika tanaman cengkeh

Divisi	: Spermatophyta
Sub Divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledoneae
Sub kelas	: Monochlamydae
Bangsa	: Caryophyllales
Suku	: Caryophyllaceae
Famili	: Myrtaceae
Spesies	: <i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Meer. & Perry

(Syamsuhidayat dan Hutapea, 1991)

b. Daerah produksi bunga cengkeh

Banyak daerah di Indonesia yang sesuai untuk membudidayakan cengkeh, diantaranya Aceh, Lampung, Padang, Jawa Barat, Jawa Tengah, Jawa Timur, Bali, Sulawesi Utara, Sulawesi Tengah, Sulawesi Selatan, Ternate, Tidore, Makian, Amboyna, Nusa Laut, Saparua, Amadina, Seram, dan Banda (di Kepulauan Maluku) (Najiyati dan Danarti, 2003). Cengkeh Maluku berperingkat pertama ditinjau dari keluaran dalam perdagangannya, disusul dengan Sumatera dan Sulawesi (Guenther, 1990). Para pengusaha rokok kretek berpendapat bahwa berdasarkan sifat fisik dan kandungan eugenol mutu minyak cengkeh produksi Indonesia lebih rendah dibandingkan dengan cengkeh luar negeri. Mutu cengkeh produksi dalam negeri dibedakan berdasarkan perbedaan daerah tempat

tumbuhnya. Cengkeh dari Manado (Sulawesi) dan Ambon (Maluku) termasuk mutu yang baik dan menyamai cengkeh dari Zanzibar. Cengkeh dari Banda, Aceh, dan Padang (Sumatera) termasuk mutu nomor dua. Cengkeh dari Semarang (Jawa) termasuk mutu rendah (Ketaren, 1985).

c. Morfologi tanaman cengkeh

Cengkeh merupakan tanaman tropis berakar tunggang bercabang panjang dan kuat. Tanaman ini tingginya dapat mencapai 20–30 meter, dan dapat berumur lebih dari 100 tahun (Ketaren, 1985). Tajuk tanaman cengkeh umumnya berbentuk kerucut, piramida, atau piramida ganda, dengan batang utama menjulang keatas. Cabang–cabangnya sangat banyak dan rapat, pertumbuhan agak mendatar dan ukurannya relatif kecil jika dibandingkan dengan batang utama. Daunnya kaku, berwarna hijau atau hijau kemerahan, dan berbentuk dengan kedua ujungnya runcing. Daun–daun ini biasanya keluar per periode. Ujung ranting dalam satu periode akan mengeluarkan satu set daun yang terdiri atas lima pasang. Masing–masing pasang terdiri atas dua daun yang terletak saling berhadapan. Cengkeh memiliki 4 jenis akar, yaitu akar tunggang, akar lateral, akar serabut, dan akar rambut (Najiyati dan Danarti, 2003). Tanaman cengkeh mulai berbunga setelah berumur 4–6 tahun, tergantung pada jenis tanaman, pemeliharaan tanaman, dan kesuburan tanah. Bunga cengkeh bertangkai pendek, panjangnya 12–19 mm berwarna hijau pada waktu muda, kemudian setelah cukup tua berwarna kemerahan, dan akhirnya merah (Ketaren, 1985).

d. Pengumpulan bunga cengkeh

Waktu yang paling baik untuk pemungutan bunga cengkeh adalah sekitar 6 bulan setelah bakal bunga tumbuh, yaitu setelah satu atau dua bunga pada tandon menjadi mekar dan berwarna kuning kemerahan. Cengkeh pada umumnya dipetik dengan tangan, dengan menggunakan tangga atau galah dari bambu. Pemungutan dilakukan dengan cara memetik tangkai bunga, kemudian dimasukkan ke dalam keranjang atau kain. Syarat yang perlu dalam pemetikan bunga antara lain:

- 1) Umur bunga harus cukup tua, dan belum sampai mekar.
- 2) Saat pemetikan sebaiknya tidak pada saat turun hujan.
- 3) Intensitas matahari yang cukup untuk pengeringan bunga.

Cengkeh yang akan dikeringkan terlebih dahulu harus dipisahkan dari bagian tangkai atau gagang. Pengeringan dianggap selesai jika cengkeh telah mencapai stadium “kering patah”, yaitu jika bagian kepala cengkeh mudah dilepaskan dan susut berat sekitar 70%, serta bunga berwarna coklat tua (Ketaren, 1985)

e. Isolasi minyak atsiri

Rendemen dan sifat fisiko kimia minyak tergantung dari sumber dan mutu minyak cengkeh, perlakuan sebelum penyulingan (dirajang atau tanpa dirajang) dan metode yang digunakan (penyulingan air, penyulingan air dan uap, atau penyulingan uap). Minyak cengkeh pada alat penampung destilat berada dibawah lapisan air karena BJ minyak atsiri lebih besar dari 1 (lebih besar dari BJ air) (Ketaren, 1985).

Dikenal 3 macam sistem penyulingan, yaitu:

1) Penyulingan dengan air

Bahan yang akan disuling langsung kontak dengan air mendidih. Simplisia yang telah dipotong–potong, digiling kasar atau digerus halus dididihkan dengan air, uap air dialiri melalui pendingin, sulingan berupa minyak yang belum murni ditampung. Penyulingan dengan cara ini sesuai untuk simplisia kering yang tidak rusak dengan pendidihan. Keuntungan dari penyulingan air adalah alatnya cukup sederhana, kuat, harganya lebih murah, serta dapat dipindah–pindahkan. Kelemahan dari penyulingan air adalah pengestraksian minyak atsiri tidak dapat berlangsung dengan sempurna walaupun bahan dirajang dan komponen minyak yang bertitik didih tinggi dan bersifat larut air tidak dapat menguap secara sempurna sehingga komponen minyak yang dihasilkan tidak lengkap (Ketaren, 1985).

2) Penyulingan dengan air dan uap

Bahan diletakkan di atas piring yang berupa ayakan yang terletak beberapa sentimeter di atas permukaan air dalam ketel penyuling. Cara ini baik untuk simplisia basah atau kering yang rusak pada pendidihan. Untuk simplisia kering perlu dimaserasi lebih dulu, sedangkan untuk simplisia segar yang baru tidak perlu maserasi. Keuntungan menggunakan penyulingan uap dan air adalah bahan dan suhu dapat dipertahankan sampai 100°C karena uap berpenetrasi secara merata ke dalam jaringan, lama penyulingan relatif singkat, rendemen minyak lebih besar dan mutunya lebih baik jika dibandingkan dengan minyak hasil sistem penyulingan dengan air, dan bahan yang disuling tidak dapat menjadi gosong

(Ketaren, 1985). Penyulingan dengan cara ini adalah cara yang paling banyak digunakan oleh petani Indonesia untuk mendapatkan minyak atsiri yang terdapat pada cengkeh (Anonim^a, 2009).

3) Penyulingan dengan uap

Air sebagai sumber uap panas terdapat dalam *boiler* yang letaknya terpisah dari ketel penyuling. Uap yang dihasilkan mempunyai tekanan lebih tinggi dari tekanan udara luar. Penyulingan dengan uap sebaiknya dimulai dengan tekanan uap rendah (kurang lebih 1 atmosfer), kemudian secara berangsur–angsur tekanan uap dinaikkan menjadi kurang lebih 3 atmosfer. Jika permulaan penyulingan dilakukan pada tekanan tinggi, maka komponen kimia dalam minyak akan mengalami dekomposisi. Jika minyak dalam bahan dianggap sudah habis tersuling, maka tekanan uap perlu diperbesar lagi yang bertujuan untuk menyuling komponen kimia yang bertitik didih tinggi. Cara ini baik digunakan untuk membuat minyak atsiri dari biji, akar, kayu yang umumnya mengandung komponen minyak yang bertitik didih tinggi, misalnya minyak cengkeh, kayu manis, akar wangi, ketumbar, sereh, minyak “*boise de dose*”, “*ssassafras*”, “*cumin*”, “*cendar wood*”, kamfer, kayu putih, “*pimento*”, “*eucalyptus*” dan jenis minyak lainnya yang bertitik didih tinggi (Ketaren, 1985).

f. Minyak atsiri kuncup bunga cengkeh

Minyak atsiri disebut juga minyak menguap, minyak eteris, atau minyak *essensial* karena pada suhu biasa (suhu kamar) mudah menguap di udara terbuka. Istilah *essensial* dipakai karena minyak atsiri mewakili bau dari tanaman asalnya. Minyak atsiri umumnya tidak berwarna, namun pada penyimpanan lama minyak

atsiri dapat teroksidasi dan membentuk resin serta warnanya berubah menjadi lebih tua (gelap). Minyak atsiri harus terlindung dari pengaruh cahaya (disimpan dalam bejana yang gelap), bejana diisi sepenuh mungkin, bejana ditutup rapat, bejana disimpan ditempat yang kering dan sejuk untuk mencegah minyak atsiri berubah warna (Gunawan dan Mulyani, 2004).

Tanaman cengkeh mempunyai sifat khas karena semua bagian pohon mengandung minyak, mulai dari akar, batang, daun, sampai bunga. Kandungan minyak cengkeh pada bagian-bagian tanaman tersebut bervariasi jumlahnya. Kandungan minyak paling tinggi terdapat pada bagian bunga (Ketaren, 1985). Bunga merupakan bagian yang paling penting dari tanaman cengkeh mengandung 10–20% minyak atsiri, sedangkan tangkai mengandung 5–10% minyak atsiri dan daun mengandung 1–4% minyak atsiri (Nurdjannah, 2004).

g. Mutu minyak atsiri bunga cengkeh

Mutu minyak atsiri didasarkan atas kriteria atau batasan yang dituangkan di dalam standar mutu (Tabel 1.). Standar mutu mencantumkan sifat–sifat yang umum terdapat dalam minyak atsiri, sifat–sifat tersebut bukan merupakan hal yang dipaksakan, akan tetapi sifat tersebut adalah sifat yang seharusnya dimiliki oleh setiap jenis minyak atsiri. Sifat fisik dapat digunakan untuk mengetahui keaslian minyak atsiri tersebut.

**Tabel 1. Parameter Mutu Minyak Atsiri Bunga Cengkeh
Berdasarkan SNI 06-4267-1996**

No.	Parameter Mutu	Persyaratan
1	Warna	Tak berwarna – Kuning muda
2	Bobot Jenis 25/25°C	1,030 – 1,060
3	Indeks Bias 25°C	1,527 – 1,535
4	Putaran Optik	0° – 1°35
5	Kelarutan dalam Etanol 70%	1:2 jernih, seterusnya jernih
6	Eugenol Total (v/v)	80 – 95%
7	Minyak Pelikan	Negatif
8	Lemak	Negatif

Sifat kimia minyak atsiri dapat memberikan gambaran secara umum komponen kimia yang terdapat didalam minyak atsiri tersebut. Komponen kimia mayor dari minyak atsiri akan menentukan nilai (harga) dan kegunaan minyak tersebut (Ketaren, 1985).

h. Kegunaan minyak atsiri cengkeh

Pemakaian utama minyak cengkeh adalah untuk diambil eugenol, iso-eugenol, dan zat vanili buatan yang dipakai pada industri kimia sebagai zat dasar untuk menyusun bermacam-macam jenis persenyawaan. Metabolit cengkeh yang paling banyak adalah eugenol, eugenol asetat, dan kariofilen. Senyawa-senyawa tersebut mempunyai sifat sebagai antibakteri dan antijamur (Ayoola *et al*, 2008). Eugenol, iso-eugenol, dan zat vanili dalam minyak atsiri cengkeh dipakai pada industri kimia sebagai zat dasar untuk menyusun bermacam-macam jenis persenyawaan (Anonim, 1991). Turunan eugenol atau turunan metoksifenol secara besar-besaran digunakan dalam parfum, perasa (*flavoring*), formulasi obat oles anti nyamuk, penyerap UV, analgetik, *bioside*, antiseptik, stabilisator dan antioksidan pembuatan plastik dan karet (Lee dan Shibamoto, 2001 *cit* Alma *et al*,

2007). Minyak cengkeh mempunyai aktivitas biologi sebagai antivirus melawan virus hepatitis C (Hussein, *et al*, 2000 *cit* Chaieb *et al*, 2007). Eugenin yang ada didalam minyak atsiri cengkeh diidentifikasi sebagai senyawa anti-HSV (Kurokawa, *et al*, 1998 *cit* Chaieb *et al*, 2007). *Cinamaldehyde* dari minyak cengkeh mereduksi mutagenesis yang diinduksi UV sebgus mutagenesis yang induksi oleh *furylfuramide* (AF-2) dalam *E. Coli* WP2s (Ohta *et al*, 1983 *cit* Chaieb *et al*, 2007).

2. Metabolit sekunder dan analisis *metabolomics*

Metabolit sekunder didefinisikan sebagai zat kimia bukan nutrisi yang memainkan peran penting dalam proses keberadaan dan evaluasi bersama antar jenis di lingkungan (Mursyidi, 1989). Konsentrasi metabolit sekunder dan komposisinya dipengaruhi oleh faktor internal (genetik, kondisi kesehatan tanaman, umur) dan faktor eksternal (lingkungan, perawatan dengan obat) (Fancy and Rumpel, 2008). Metabolit sekunder mempunyai peran yang mendukung keberadaan organisme di lingkungan, yaitu sebagai hasil detoksifikasi metabolit primer, signal intraorganisme, signal komunikasi antar organisme, dan sistem keseimbangan ekologi (Mursyidi, 1989).

Analisis metabolit dapat dibagi menjadi 4 yaitu:

a. Analisis komponen target (*Target compound analysis*)

Kuantifikasi dari metabolit spesifik.

b. *Metabolite profiling*

Metode untuk penentuan kuantitatif atau kualitatif dari kelompok senyawa metabolit spesifik. Kata *metabolite profiling* digunakan oleh Horning pada tahun

1970. *Metabolite profiling* telah digunakan untuk menganalisis lemak, *isoprenoid*, saponin, karotenoid, *steroid*, dan asam-asam.

c. *Metabolomics*

Analisis kualitatif dan kuantitatif dari keseluruhan metabolit. Preparasi sampel dan perolehan data dalam metode ini ditujukan meliputi semua kelas senyawa-senyawa, dengan *recovery*, reproduisibilitas, dan *robustness experimental* tinggi.

d. *Metabolomic fingerprinting*

Klasifikasi sampel menurut keterkaitan *biological* dan asal-usulnya dan digunakan untuk *fungsiional genomic*. Metode ini merupakan metode yang cepat untuk analisis umum tanpa identifikasi komponen luas

(Anonim^b, 2009).

Kata “*Metabolome*” menggambarkan semua komplemen dari metabolit ber-bobot molekul rendah dalam sel biologi dan profil kimia (*fingerprint* metabolit) yang dapat dilihat dalam jaringan utuh. *Metabolome* mewakili sejarah hidup dari organisme individu, meliputi umur dan faktor lingkungan seperti jenis tanah, kelembaban, suhu, dan *stress* (tekanan) (Sarker *et al*, 2006). Kajian analisis detail dari *metabolome* ditunjukkan sebagai “*metabolomics*”. *Metabolomics* adalah identifikasi sistematis dan kuantifikasi seluruh metabolit dalam organisme atau sampel biologi (Idle dan Frank, 2007).

Kajian *metabolomics* sering menggunakan *gas chromatography (GC)* dan *Liquid chromatography (LC)* untuk sistem pemisahan. *Mass spectrometry (MS)*, *nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR)*, UV dan spektroskopi cahaya

tampak, dan pengujian berdasarkan enzim digunakan untuk sistem deteksi jumlah (banyaknya) metabolit (Desbrosses, 2005). Penggabungan dari sistem pemisahan dan pendeteksian, seperti *GC-MS*, mampu digunakan untuk menganalisis metabolit yang berjumlah ribuan baik yang sudah diketahui maupun yang belum diketahui. Instrumentasi analisis menggunakan *GC-MS* menghasilkan *signal* yang terdiri dari *peak* informatif. *Signal peak* dikaitkan dengan keberadaan metabolit dan dapat digunakan untuk pengukuran kuantitatifnya (De Souza *et al*, 2006).

Metabolomics dengan *gas chromatography mass spectrometry (GC-MS)* berdasar *metabolite profiling* dari ekstrak biologi secara cepat menjadi prinsip dasar dari *functional genomics* dan sistem biologi. *Metabolite profiling* diaplikasikan dalam penemuan metode dari aksi obat atau herbisida, dan dalam mencurahkan pengaruh dari perubahan ekspresi gen dalam metabolisme dan organisme performance dalam aplikasi bioteknologi (Kopka, 2005). *Metabolite profiling* dengan *GC-MS* meliputi 6 tahap (Desbrosses, 2005):

- 1) Ekstraksi metabolit dari sampel
- 2) Derivatisasi metabolit untuk membuatnya *volatile* dan mudah diterima *GC* (untuk senyawa yang tidak mudah menguap)
- 3) Pemisahan dengan *GC*
- 4) Ionisasi senyawa yang dielusi dari *GC*
- 5) Deteksi ion molekuler
- 6) Evaluasi data dimulai dengan mencocokkan waktu retensi dan pola fragmentasi spektra massa dari referensi *database*.

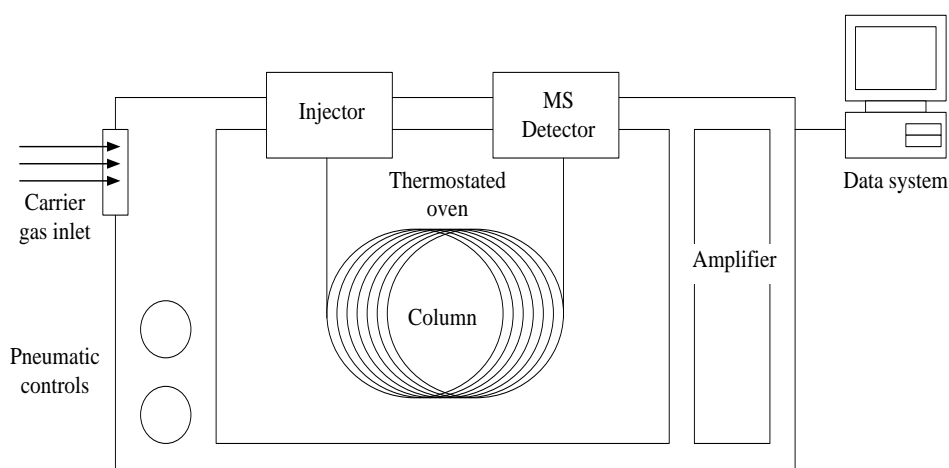
Penelitian Alma *et al* meneliti bunga cengkeh Turki terdiri dari 2-heptanon, α -pinen, p-cimen, limonen+1,8 sineol, 2-heptil asetat, (E)-beta-ocimen, 2-nonanon, linalool, metil salisilat, p-alil fenol, eugenol, alfa-kopaen, beta-kariofilen, alfa-humulen, delta-kadinen, eugenol asetat, kariofilen oksid, 2(12),6(13)-kariofilen-dien-5-ol. Penelitian Ayoola *et al* mendapatkan 8 senyawa dengan 3 senyawa mayor yaitu eugenol, eugenol asetat, dan kariofilen. Penelitian Viuda *et al* melaporkan dalam minyak atsiri cengkeh ada 4 senyawa mayor yaitu eugenol, beta-kariofilen, alfa-humulen, delta kadinen.

3. *Gas Chromatography Mass Spectroscopy (GC-MS)*

Perkembangan teknologi instrumentasi yang sangat pesat melahirkan suatu alat yang merupakan gabungan antara kromatografi gas dan spektrometri massa (*GC-MS*) (Gambar 1). Kromatografi gas berfungsi sebagai alat pemisah berbagai komponen campuran dalam sampel, sedangkan spektrometer massa berfungsi untuk mendeteksi masing-masing molekul komponen yang telah dipisahkan pada sistem kromatografi gas (Agusta, 2000). Satu keuntungan dari *GC-MS* adalah identifikasinya berdasarkan waktu retensi dan spektrum massa (pola fragmentasi senyawa) (Anonim^c, 2009).

Kebanyakan penyelidikan dengan kromatografi gas-spektrometri massa (*GC-MS*) dapat dibagi dalam dua kelompok, yaitu: penjatidirian obat atau metabolit dan kuantitasi obat dalam cairan hayati. Pada penjatidirian penekanan pada perolehan spektrum massa dari senyawa, lalu dibandingkan dengan spektra baku, ini digunakan untuk menjelaskan struktur analit. Bukti struktur juga dikuatkan oleh waktu tambat pada kolom terpilih kromatografi gas. Untuk

kuantitasi obat dalam terokan hayati ditekankan pada selektivitas dan kepekaan. Kedua kondisi ini dipenuhi dengan penggunaan spektrometer massa sebagai detektor (Munson, 1991).



Gambar 1. Gas Chromatography Mass Spectroscopy (GC-MS)

Unsur-unsur penting dalam sistem *GC-MS*:

a. Gas pembawa

Faktor yang menyebabkan suatu senyawa bergerak melalui kolom kromatografi gas ialah keatsiriannya, aliran gas yang melalui kolom yang diukur dalam satuan ml/menit, serta penurunan tekanan antara pangkal dan ujung kolom. Gas pembawa harus memenuhi sejumlah persyaratan, antara lain harus *inert* (tidak bereaksi dengan sampel, pelarut sampel, material dalam kolom), murni, dan mudah diperoleh. Pemilihan gas pembawa tergantung pada detektor yang dipakai. Kemurnian gas pembawa sangat penting. Penggunaan gas yang kemurniannya rendah sering dijumpai sejumlah puncak yang bukan berasal dari sampel yang dianalisis (*ghost peak*) dan *baseline* kromatogram tidak rata (Agusta, 2000). Oleh karena itu, gas pembawa sebelumnya dialirkan melalui penyaring molekul untuk

menghilangkan uap air yang terdapat dalam gas pembawa (Sudjadi, 1988). Sebagai gas pembawa pada *GC-MS* biasanya digunakan helium karena ringan, relatif mudah dihilangkan dengan sistem pompa hampa (Munson, 1991).

b. Kolom

Kolom merupakan jantung dari kromatografi gas karena didalam kolom inilah sampel dianalisis sehingga beberapa komponen dapat dipisahkan dan terelusi pada waktu yang berbeda (Adnan, 1997). Beberapa faktor yang mempengaruhi kolom antara lain ukuran kolom, jenis padatan pendukung fase diam, ukuran partikel padatan pendukung dan fase cairan yang digunakan sebagai fase diam (Mursyidi, 1989).

Ada dua macam kolom, yaitu kolom kemas dan kolom kapiler. Kolom kemas adalah pipa yang terbuat dari logam, kaca, atau plastik yang berisi penyangga padat yang *inert*. Fase diam baik berwujud padat maupun cair, diserap atau terikat secara kimia pada permukaan penyangga padat tersebut. Diameter kolom biasanya 2–4 mm dengan panjang 0,5–6 meter (Agusta, 2000).

Kolom kapiler pertama kali diperkenalkan oleh M.J.E Golay pada tahun 1956. Keuntungan penggunaan kolom ini adalah jumlah sampel yang dibutuhkan hanya sedikit, gas pembawa yang dibutuhkan juga sedikit, dan pemisahan lebih sempurna. Kolom kapiler dibedakan menjadi 4 tipe yang didasarkan pada diameter sebelah dalamnya.

1) *Narrow bore*

Kolom ini berdiameter 0,1 mm, digunakan untuk melakukan analisis dengan waktu yang relatif pendek atau analisis cepat. Kolom tipe ini dapat

memisahkan campuran dengan konsentrasi sekitar 10 ng untuk masing-masing komponen.

2) *Middle bore*

Kolom ini berdiameter 0,22–0,25 mm, memiliki daya pisah yang tinggi, dapat memisahkan campuran dengan konsentrasi 50–100 ng untuk masing-masing komponen. Untuk menganalisis komponen minyak atsiri, lebih disarankan menggunakan kolom ini.

3) *Semi wide bore*

Kolom ini berdiameter 0,32 mm, penggunaannya lebih ditujukan untuk analisis yang membutuhkan sensitivitas yang tinggi. Kolom *semi wide bore* dapat memisahkan campuran dengan konsentrasi 150–300 ng untuk masing-masing komponen.

4) *Wide bore*

Kolom ini berdiameter 0,50–0,53 mm. Kolom *wide bore* dapat memisahkan campuran dengan konsentrasi 500–2500 ng untuk masing-masing komponen, penggunaan kolom ini ditujukan untuk analisis campuran yang relatif lebih banyak (Agusta, 2000).

c. Fase Diam

Fase diam biasanya disapukan pada permukaan dalam medium, seperti tanah diatomae dalam kolom atau dilapiskan pada dinding kapiler. Berdasarkan bentuk fisiknya, fase diam yang umum digunakan pada kolom adalah fase diam padat dan fase diam cair. Akan tetapi, untuk kolom kapiler lebih banyak digunakan fase diam cair yang disebut dengan istilah *film thickness*. Ketebalan

fase diam ini berbeda untuk masing-masing tipe kolom kapiler. Kolom tipe *narrow bore* memiliki *film thickness* setebal 0,1 μ m, tipe *middle bore* 0,25–0,5 μ m, tipe *semi-wide bore* 0,5–1,0 μ m, dan tipe *wide-bore* 1,0–5,0 μ m. Berdasarkan sifatnya, fase diam dibedakan berdasarkan kepolarannya yaitu nonpolar, sedikit polar, setengah polar (semi polar), dan sangat polar (Agusta, 2000).

Pemilihan fase diam cair biasanya didasarkan atas pedoman *like dissolves like*. Hal ini berarti bahwa fase diam yang bersifat polar cocok untuk sampel yang bersifat polar dan sample-sampel yang non polar akan terpisah dengan baik pada fase cair non polar (Adnan, 1997). Berdasarkan sifat minyak atsiri yang nonpolar sampai sedikit polar, untuk keperluan analisis sebaiknya digunakan kolom dengan fase diam nonpolar atau sedikit polar. (Agusta, 2000).

Tabel 2. Fase Diam yang Digunakan pada Analisis Kromatografi GC-MS

Fase diam	Jenis	Kepolaran	Suhu minimum – maksimum (°C)
Apiezon L	Hidrokarbon	Nonpolar	50 – 250
Carbowax 20 M	Polietilen glikol	Polar	60 – 250
DC QF-I	Trifluoropropilmetil-silikon	Sedang	0 – 250
Dexsil 300 GC	Karbon-metil silikon	Sedang	50 – 400
OV-1	Metil silikon	Nonpolar	50 – 350
Karet gom silikon (SE-30)	Metil	Nonpolar	50 – 300
Versamid 900	Poliamida	Polar	190 – 275
HP-5MS	(5%-Phenyl)-methylpolysiloxane	Nonpolar	-60–325 atau 350
Rtx®-5MS	5% diphenyl/ 95% dimethyl polysiloxane)	Nonpolar	-60 – 350
Rxi™-1MS	100% dimethyl polysiloxane)	Nonpolar	-60 – 330 atau 350

(Munson, 1991; Anonim^d, 2009; Anonim^e, 2009; Anonim^f, 2009)

d. Detektor

Detektor dalam *GC-MS* adalah spektroskopi massa yang terdiri atas sistem ionisasi dan sistem analisis (Agusta, 2000). Spektroskopi massa berdasarkan atas ionisasi dari molekul solut dalam sumber ion dan pemisahan ion didasarkan dari hasil unit analisis rasio massa (Fowlis, 1994). Salah satu keuntungan teknik ini adalah sensitivitasnya tinggi. Spektroskopi massa dapat mendeteksi senyawa dalam jumlah mikrogram (Sarker *et al.*, 2006).

e. Suhu

Suhu merupakan salah satu faktor utama yang menentukan hasil analisis kromatografi gas dan spektrometri massa. Ada tiga macam suhu yang penting untuk pemisahan yang baik dalam *GC*, yaitu suhu tempat injeksi, suhu kolom dan suhu detektor. Suhu pada tempat injeksi harus cukup tinggi untuk menguapkan sampel tetapi tidak terlalu tinggi, sebab kalau terlalu tinggi akibatnya kemungkinan terjadinya perubahan oleh panas atau peruraian dari molekul-molekul. Suhu pada kolom harus cukup tinggi sehingga analisis dapat diselesaikan dalam waktu yang layak dan harus cukup rendah (Mc Nair and Bonelli, 1988). Suhu-suhu yang rendah memberikan pemisahan lebih baik, tetapi waktu retensi lebih panjang (Gritter, 1991).

f. Sistem injeksi

GC-MS memiliki dua sistem pemasukan sampel (*injection*), yaitu secara langsung (*direct inlet*) dan melalui sistem kromatografi gas (*indirect inlet*). Sampel campuran seperti minyak atsiri, pemasukan sampel harus melalui sistem *GC*, sedangkan untuk sampel murni dapat langsung dimasukkan ke dalam ruang

pengion (*direct inlet*) (Agusta, 2000). Penginjeksian yang lambat untuk sampel yang terlalu besar akan menyebabkan pelebaran pita dan pemisahan yang buruk (Mursyidi, 1989).

g. Sistem ionisasi

Ada beberapa metode ionisasi untuk analisis spektrometer massa. *Electron Impact ionization (EI)* adalah metode ionisasi yang umum digunakan (Agusta, 2000). *EI* merupakan proses ionisasi yang sulit, bukan dikarenakan oleh tabrakan antara molekul sampel tapi oleh interaksi antara elektron dan molekul ketika elektron lewat berdekatan. Proses ini menghasilkan perpindahan satu elektron dari molekul sampel, dengan anggapan ion ini tidak mengalami fragmentasi ditunjukkan sebagai “ion molekuler”. Ion molekuler adalah molekul dengan satu elektron yang dilepaskan, ion molekuler akan mempunyai jumlah massa yang sama sebagai molekul netral. Ion yang lain dalam spektrum diturunkan dari dekomposisi ion molekuler. *EI* memperbolehkan penentuan dari massa relatif molekuler dan struktur dari molekul. Elektron dihasilkan oleh lewatnya arus tertentu menembus *tungsten filament*. Elektron ini menyebabkan analit menjadi diionisasi dan difragmentasi. Semua muatan positif ion dibentuk dalam sumber ion dimasukkan kedalam *quadrupole* (Anonim^c, 2009).

h. Sistem analisis

Sistem analisis yang digunakan pada spektrometer ini juga ada beberapa macam. Sistem yang umum digunakan adalah sistem kuadropol dengan batang (empat buah) yang mempunyai 4 kutub dan terletak antara sumber ion dan detektor (Agusta, 2000).

i. Sistem pengolahan data dan identifikasi senyawa

Berdasarkan analisis *GC-MS* diperoleh dua informasi dasar, yaitu hasil analisis kromatografi gas yang ditampilkan dalam bentuk kromatogram dan hasil analisis spektrometri massa yang ditampilkan dalam bentuk spektrum massa. Kromatogram memberikan informasi mengenai jumlah komponen kimia yang terdapat dalam campuran yang dianalisis (jika sampel berbentuk campuran) yang ditunjukkan oleh jumlah puncak yang terbentuk pada kromatogram berikut kuantitas masing-masing. Spektrum massa hasil analisis sistem spektroskopi massa merupakan gambaran mengenai jenis dan jumlah fragmen molekul yang terbentuk dari suatu komponen kimia (masing-masing puncak pada kromatogram). Setiap fragmen yang terbentuk dari pemecahan suatu komponen kimia memiliki berat molekul yang berbeda dan ditampilkan dalam bentuk diagram dua dimensi, m/z (m/e , massa/muatan) pada sumbu X dan intensitas pada sumbu Y yang disebut spektrum massa (Agusta, 2000).

E. Keterangan Empiris

Hasil penelitian ini memberikan informasi tentang daerah yang mempunyai mutu minyak atsiri bunga cengkeh yang bagus berdasar kelengkapan metabolitnya.